动 物 学 研 究 1999, Aug. 20 (4): 247～251 CN 53－1040/Q ISSN 0254－5853
Zoological Research

褐家鼠线粒体 DNA 遗传多态性的研究*

李菁菁[①②] 彭统序[①] 温硕洋[①] 谢以权[①]
(①广东省昆虫研究所 广州 510260 genet@gdei.gis.sti.gd.cn) (②中山大学生命科学学院 广州 510275)

摘 要 通过碱变性法提取线粒体 DNA(mtDNA),用地高辛标记的探针 Southern 杂交进行限制性酶切多态性(RFLP)分析,研究中国褐家鼠 *Rattus norvegicus* 遗传多态性。采用 *Apa* Ⅰ、*Ava* Ⅰ、*Bam* HⅠ、*Bcl* Ⅰ、*Bgl* Ⅰ、*Cla* Ⅰ、*Eco* RⅠ、*Eco* RⅤ、*Hin* dⅢ、*Pvu* Ⅱ、*Sca* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ等 12 种限制性内切酶分析来自我国 8 个地区 26 只褐家鼠的线粒体 DNA,共检出 20 种限制性态型(morph)和 11 种 mtDNA 单倍型。其中 *Bam* HⅠ、*Eco R*Ⅴ、*Sca* Ⅰ和 *Bcl* Ⅰ等 5 种限制酶检测到多态性,限制性态型间差异 1～2 个切点。各单倍型间的遗传距离 0.002～0.014,平均遗传距离 0.0095。根据已发表的资料,计算出我国褐家鼠与实验大鼠之间的遗传距离约 0.0087。结果表明我国褐家鼠在 mtDNA 水平呈现广泛的种内遗传多态性,个体间、群体内和群体间存在一定的遗传变异,群体内和群体间的遗传分化程度处于相近的水平。

关键词 褐家鼠, 线粒体 DNA (mtDNA), RFLP, 遗传多态性
中图分类号 Q959.837

褐家鼠 *Rattus norvegicus* 是世界性分布的鼠类, 与人类活动有密切关系, 其起源和演化一直是兽类学和进化生物学关注的问题。关于褐家鼠的起源目前尚存在争议。许多学者认为中国是褐家鼠重要的起源地之一(Graaff,1981;Walker,1991),中国地处古北界和东洋界, 在 7 个动物地理区广泛分布褐家鼠。这些不同地理群体的遗传特性、群体间的遗传变异及其与亚种分化的关系很值得研究。我国学者曾进行褐家鼠血红蛋白的研究, 发现存在多态型 (周庆灿等, 1985), 但血红蛋白随种群密度和季节而变化, 难以反映不同褐家鼠种群的遗传差异, 这方面工作有待进一步的深入。

高等动物线粒体 DNA (mtDNA) 分子量小, 拷贝数高, 一般呈母系遗传, 不易发生重组, 进化速率相对较快, 以及具有广泛的种内群体遗传多态性等特点, 使得线粒体 DNA 分析成为遗传多态性研究和动物进化学研究有效的方法之一 (张亚平等, 1992)。国外学者曾采用线粒体 DNA 的限制性内切酶分析, 研究美国和日本野生褐家鼠以及实验大白鼠种内遗传差异 (Brown 等, 1981a, b)。我们通过对中国多个地区褐家鼠进行线粒体 DNA 的 RFLP 分析, 开展遗传多态性研究, 对进一步了解褐家鼠的种内遗传变异及其与系统进化的关系, 为研究褐家鼠的起源演化提供中国方面的资料有重要的意义。

1 材料和方法

1.1 动物来源

野生褐家鼠 26 只,分别捕自北京昌平县(2 只)、呼和浩特桃花乡(2 只)、西宁市饲料仓库(3 只)、昆明市郊(2 只)、上海市区(5 只)、南昌市区(5 只)、福州市郊(2 只)和广州市区(2 只)及近郊(3 只)8 个地区,采集时间 1996 年 3 月～11 月。取肝脏、心和肾脏,4℃运输到实验室后,保存于－20℃。

1.2 试 剂

限制性内切酶购自美国 Life Technologies 公司和德国 Boehringer Mannheim 公司,RNase Ⅰ华美生物技术公司产品,SDS 为 Serva 进口分装,地高辛标记和核酸检测试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司,其他试剂为国产分析纯。

1.3 mtDNA 提取和纯化

按照前文所述方法进行 (李菁菁等, 1998)。

* 中国科学院广州分院、广东省科学院院长基金资助项目
本文 1998－08－13 收到, 1999－01－18 修回

1.4 限制性内切酶分析

mtDNA分别用12种限制性内切酶消化,酶解反应采用厂家提供的缓冲液在37℃下消化5～12 h。0.8%～1.0%琼脂糖凝胶电泳分离,溴化乙锭染色,紫外灯下观察。当DNA量太低,溴化乙锭染色检测不出,通过Southern杂交分析。

1.5 地高辛标记的mtDNA探针的制备

从褐家鼠新鲜肾脏、肝脏提纯的mtDNA用限制酶 *Cla* Ⅰ完全酶切成单一的线性带，酶解产物用低溶点琼脂糖回收DNA方法进一步纯化（肖武汉等，1997)。纯化后的mtDNA用 *Eco* RⅠ酶切成小片段，37℃消化过夜。反应混合物用酚:氯仿（异戊醇）抽提1次，2倍体积乙醇沉淀。然后用地高辛标记制备mtDNA探针，具体操作按DIG DNA Labeling Kit中的步骤进行。

1.6 Southern杂交分析

通过Southern转移将DNA从凝胶转移至尼龙膜,参照《分子克隆实验指南》(萨姆布鲁克等,1993)中的方法进行,在20×SSC中转移24 h左右。置尼龙膜于120℃烘烤15～20 min,将DNA固定于膜上。杂交在杂交袋(塑料袋)进行,68℃预杂交4 h,换含有经热变性处理探针的杂交液,68℃杂交16 h左右。杂交和检测具体见DIG Nuclei Acid Detection Kit中方法。

1.7 数据分析

酶切片段分子量通过比较λDNA/*Hin* dⅢ和λDNA/*Hin* dⅢ + *Eco* RⅠ酶切片段的泳动率来决定。mtDNA单倍型间的片段共享度和遗传距离,按Nei等(1979)的公式计算。片段共享度 $F=2n_{XY}/(n_X+n_Y)$,各单倍型间的序列差异度或遗传距离 $P=1-\{[-F+(F^2+8F)^{1/2}]/2\}^{1/6}$。通过UPGMA分析法构建单倍型间的聚类图。

2 结果和讨论

本实验用 *Apa* Ⅰ、*Bam* HⅠ、*Bgl* Ⅰ、*Eco* RⅤ、*Pvu* Ⅱ、*Sca* Ⅰ、*Ava* Ⅰ、*Bcl* Ⅰ、*Eco* RⅠ、*Hin* dⅢ、*Xba* Ⅰ和 *Cla* Ⅰ等12种限制性内切酶,将褐家鼠线粒体DNA消化成1～5个片段,其中 *Bam* HⅠ、*Bgl* Ⅰ、*Eco* RⅤ、*Sca* Ⅰ和 *Bcl* Ⅰ等5种限制酶出现多态性,具有2个以上的态型(morph),其余酶均表现单态。我们把与已发表mtDNA全序列的褐家鼠限制性态型(Gadaleta等,1989;兰宏等,1994)相同的态型定为A型,其余多态型为B、C型。各限制性片段大小和限制性态型列于表1。

表1 褐家鼠mtDNA限制性态型和片段长度

Table 1 Mitochondrial DNA restriction morphs and restriction fragment length

限制性态型 (restriction morph)	个体数 (No. of rats)	识别位点数 (No. of sites)	限制性片段长度/kb (restriction fragment length)
Apa Ⅰ	26	2	12.0, 4.3
Ava Ⅰ	26	3	9.2, 5.0, 2.3
Bam HⅠ-A	14	2	11.2, 5.1
Bam HⅠ-B	12	4	7.2, 5.1, 3.4, 0.6
Bcl Ⅰ-A	2	4	5.3, 4.3, 3.7, 2.8
Bcl Ⅰ-B	24	5	5.3, 3.8, 3.7, 2.8, 0.6
Bgl Ⅰ-A	12	2	13.3, 3.3
Bgl Ⅰ-B	2	4	6.3, 5.4, 3.3, 1.6
Bgl Ⅰ-C	12	3	11.7, 3.3, 1.6
Cla Ⅰ	26	1	16.3
Eco RⅠ	26	4	6.2, 3.9, 3.0, 2.6
Eco RⅤ-A	24	2	12.9, 3.4
Eco RⅤ-B	1	3	7.5, 5.4, 3.4
Eco RⅤ-C	1	4	12.0, 2.2, 1.2, 0.9
Hin dⅢ	26	5	6.4, 4.2, 2.8, 2.2, 0.7
Pvu Ⅱ	26	2	15.4, 0.9
Sca Ⅰ-A	23	5	8.6, 3.7, 2.2, 1.3, 0.5
Sca Ⅰ-B	1	3	11.3, 3.7, 1.3
Sca Ⅰ-C	2	4	9.1, 3.7, 2.2, 1.3
Xba Ⅰ	26	2	10.3, 6.0

从表1可见,同一限制酶态型间的差异在于酶切位点的增加或减少,*Bam* HⅠ态型A和B,*Bgl* Ⅰ态型A和B,*Eco* RⅤ态型A和C,*Sca* Ⅰ态型A和B间均有2个位点的差异,其余多态限制酶的态型间只有1个位点差异。在单态酶中只有 *Eco* RⅠ酶切态型不为A型,而与日本褐家鼠的酶切态型相同。*Bam* HⅠ-B、*Bcl* Ⅰ-B、*Bgl* Ⅰ-B和-C、*Eco* RⅤ-B和-C、*Sca* Ⅰ-B和-C等多态型尚未见报道。

表 2 褐家鼠 mtDNA 的单倍型及其各地理群的分布

Table 2 Mitochondrial DNA haplotypes and geographic distribution

采样点 (locality)	样品数 (No.of individuals)	单倍型 (haplotype)	限制性态型 (restriction morph)					
			Bam HⅠ	*Bgl* Ⅰ	*Eco* RⅤ	*Sca* Ⅰ	*Bcl* Ⅰ	*Eco* RⅠ
西宁 (Xining)	2	Ⅰ	A	A	A	A	B	B
昆明 (Kunming)	2	Ⅰ	A	A	A	A	B	B
北京 (Beijing)	1	Ⅱ	A	A	A	B	B	B
北京 (Beijing)	1	Ⅲ	B	B	A	A	B	B
上海 (Shanghai)	5	Ⅳ	B	A	A	A	B	B
呼和浩特 (Huhehaote)	1	Ⅴ	A	B	A	A	B	B
呼和浩特 (Huhehaote)	1	Ⅵ	A	C	A	A	B	B
广州 (Guangzhou)	3	Ⅵ	A	C	A	A	B	B
广州 (Guangzhou)	1	Ⅶ	A	A	C	A	B	B
广州 (Guangzhou)	1	Ⅷ	B	C	A	A	B	B
南昌 (Nanchang)	5	Ⅸ	B	C	A	A	A	B
福州 (Fuzhou)	2	Ⅹ	A	C	A	C	B	B
西宁 (Xining)	1	Ⅺ	A	A	B	A	B	B
发表序列*		NA	A	A	A	A	A	A

* Data from Gadaleta *et al.*, 1989.

表 3 褐家鼠 mtDNA 限制性类型间的遗传距离

Table 3 Genetic distance among different mtDNA haplotypes

单倍型 (haplotype)	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ	Ⅵ	Ⅶ	Ⅷ	Ⅸ	Ⅹ	Ⅺ	NA
Ⅰ	34											
Ⅱ	0.26	32										
Ⅲ	0.66	0.95	38									
Ⅳ	0.32	0.60	0.31	36								
Ⅴ	0.32	0.60	0.31	0.66	36							
Ⅵ	0.25	0.51	0.56	0.56	0.24	35						
Ⅶ	0.50	0.79	1.18	0.84	0.84	0.76	36					
Ⅷ	0.58	0.87	0.22	0.23	0.56	0.32	1.11	37				
Ⅸ	0.87	1.18	0.47	0.49	0.84	0.58	1.42	0.23	36			
Ⅹ	0.51	0.62	0.84	0.87	0.50	0.25	1.07	0.80	0.87	34		
Ⅺ	0.25	0.51	0.92	0.58	0.58	0.50	0.58	0.84	1.14	0.79	35	
NA	0.49	0.87	1.15	0.82	0.82	0.74	1.00	1.07	0.82	1.02	0.74	38

对角线的数据是所检测到的位点数，对角线以下是限制性类型间的遗传距离 (%) [the data on the diagonal are the restriction sites detected. The data below the diagonal are the genetic distance or sequence divergence (%) between haplotypes.]。

综合各限制性态型，在中国 8 个地区 26 只褐家鼠中检测到 11 种不同的单倍型（限制性类型）。11 种单倍型在各地理群的分布见表 2，同时列出已发表序列褐家鼠的 mtDNA 单倍型（NA）。

各种单倍型间的遗传距离如表 3 所示。图 1 是根据遗传距离构建的 mtDNA 单倍型间 UPGMA 聚类图。

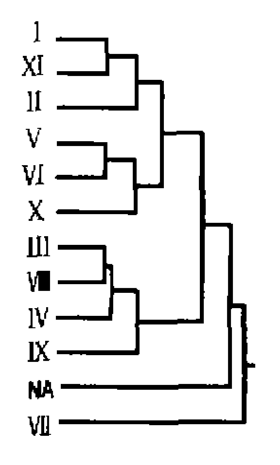


图 1 褐家鼠 mtDNA 分子聚类图 (UPGMA)

Fig. 1 UPGMA dendrogram of mtDNA haplotypes of *R. norvegicus*

Brown 等(1981b)通过 6 种限制性内切酶分析，得到褐家鼠 A、B、C 和 D 4 种 mtDNA 类型(单倍型)，分别对应于实验大鼠 A 型、B 型、美国褐家鼠和日本褐家鼠。D 型和 C 型的差别在于限制酶 *Hha* Ⅰ 多 1 个位点，*Eco* RⅠ 少 1 个位点(序列差异度 0.9%)；A 型和 B 型与 C 型之间各相差 2 个位点(序列差异度分别为 0.7% 和 0.9%)。在美国褐家鼠中还发现 C1 型，与 C 型相差 1 个 *Hin* dⅢ 位点(序

列差异度0.4%)。进一步通过识别4个碱基的内切酶 *Hin*f Ⅰ,将美国褐家鼠细分成C2、C3和C4几种类型,序列差异小于0.5%。我们分析的结果,中国褐家鼠mtDNA遗传变异相当丰富,呈现广泛的种内多态性,在26只鼠检出11种单倍型,各地理群体基本都具有其特异的单倍型(除了昆明地区和部分西宁鼠,部分呼和浩特鼠和部分广州鼠分别共有单倍型Ⅰ和Ⅵ外),有些群体不只1种类型,北京、呼和浩特和西宁地区各检出2种单倍型,广州地区检出3种单倍型。而且从各单倍型间的序列差异度(0.2%~1.4%)来看,我国褐家鼠群体内和群体间存在一定的遗传分化,群体内分化的程度接近或相当于群体间的水平。北京群体内单倍型Ⅱ和Ⅲ序列差异0.95%;广州群体内单倍型Ⅶ和Ⅵ差异0.76%,Ⅷ和Ⅶ差异1.11%。

已研究过多种鼠类种内mtDNA遗传变异,并以单倍型间的平均遗传距离 P 作为量度的指标。大家鼠(*R. rattus*) P 值为0.002~0.096,小家鼠(*Mus musculus*)4个不同亚种间的 P 值0.026~0.071,亚种内不同地理群的差异在0.4%左右(Yonekawa等,1981)。中国褐家鼠各单倍型间 $P=0.0095$(0.002~0.014),与Brown等(1981a)分析美国、日本褐家鼠和实验大鼠的结果 P 为0.003~0.018十分相近。我们根据已发表序列的褐家鼠(实验大鼠A型,认为来源于欧洲褐家鼠)的限制性态型数据,计算出与我国褐家鼠的遗传距离0.0086(0.0049~0.0115)(表3中最后一行),小于Brown等分析的实验大鼠和日本褐家鼠之间遗传距离(0.016)。说明实验大鼠与我国褐家鼠的关系比与日本褐家鼠要近得多,我国褐家鼠mtDNA遗传多态性程度相当于美国、日本褐家鼠及实验大鼠之间变异的水平,为认识褐家鼠的起源提供新的证据。

从构建的UPGMA聚类图来看,11种单倍型基本上分成三大分支,亲缘关系最近的单倍型Ⅲ与Ⅷ最先聚在一起,遗传距离0.0022,其次为Ⅴ与Ⅵ(遗传距离0.0024),Ⅰ与Ⅺ(遗传距离0.0025);单倍型(Ⅲ、Ⅷ)和Ⅳ、Ⅸ组成一个分支,(Ⅴ、Ⅵ)和Ⅹ与(Ⅰ、Ⅺ)和Ⅱ组成另一分支,单倍型Ⅶ与其他类型的关系最远,平均遗传距离0.090,为一独立的分支。但是对应于地理群体,很难从聚类图将不同群体进行归类。一方面,同一群体包含不同的类型,而且群体内(广州、北京)的遗传差异与群体间的差异相当。如广州群体有3种单倍型(Ⅵ、Ⅶ、Ⅷ),分别归在不同分支里,其中之一与呼和浩特、福州群体聚在一起,另一与上海群体相聚,第3种类型Ⅶ为一独立分支。另一方面,似乎样品地理分布的远近和遗传变异的程度不大相关,地理距离近的样品间遗传差异并不维持在较小的范围。Brown等(1981a)研究大家鼠(*R. rattus*)以及Avise等(1979)研究 *Peromyscus maniculatusc* 鼠都发现类似的现象。值得注意的是广州褐家鼠Ⅷ型与其他中国褐家鼠的关系比实验大鼠还远。造成褐家鼠群体之间无显著的遗传分化以及遗传变异与地理距离不相关,与褐家鼠的生活习性有很大关系。一般认为褐家鼠借助于人类活动,扩散的速率相当高,并由于扩散和基因流造成不同mtDNA混合,从而引入另一地区的mtDNA类型。但是由较大地理障碍相隔(如海洋)的种群间mtDNA的差异应该是明显的,因此比较不同的大地理区域mtDNA的变异,可以追溯物种扩散的历史。

吴德林(1982)曾根据形态性状的差异认为褐家鼠在我国除台湾省以外已分化出4个亚种,分别是指名亚种(分布于广东、海南岛)、甘肃亚种(甘肃、宁夏、内蒙、云南、湖北、浙江、江苏以南、江西、福建等地)、华北亚种(河北、辽宁、山东、苏北)和东北亚种,虽然我们实验样品涉及指名亚种、甘肃亚种和华北亚种的分布区域,但是目前分析的结果并没有反映地理群体与如上亚种间的对应关系,进一步分析更多和更广泛区域的样品,并结合形态数据进行综合系统地研究是非常必要的。

本次研究的样品采自全国多个地区,由于携带或运输过程中难以保证处于低温状态,故样品中mtDNA降解严重,被小片段DNA污染明显,得率很低,限制酶消化电泳后用EB染色难以分辨和分析(特别一些酶切点位点较多的酶)。通过Southern杂交,检测的灵敏度大大提高。对一些不易获取内脏和组织材料的样品,采集血液直接提取基因组DNA,用mtDNA探针杂交的方法,可得到满意的结果。

参 考 文 献

兰 宏,陈志平,王应祥等,1994.树鼩mtDNA限制性内切酶图谱及其与小家鼠褐家鼠的亲缘关系.动物学研究,15(3):39~44.[Lan H,Chen Z P,Wang Y X *et al*,1994. The mitochondrial DNA restriction map of the fea's tree mouse (*Chiromyscus chiropus*) and its evolution relationship with mouse and rat. *Zoological Research*,15(3):39-44.]

张亚平,施立明,1992.动物线粒体DNA多态性的研究概况.动物学研究,13(3):289~298.[Zhang Y P,Shi L M,1992. Animal mitochondrial DNA polymorphism. *Zoological Research*,13(3):289-298.]

肖武汉,宿 兵,吴春花等,1997.一种从鱼类卵巢制备地高辛标记mtDNA探针的简易方法.动物学研究,18(1):58.[Xiao W H,Su B,Wu C H *et al*,1997. A simple method for getting Digoxigenin labeling probe of mtDNA from ovary of fish. *Zoological Research*,18(1):58.]

李菁菁,温硕洋,戚根贤等,1998.板齿鼠线粒体DNA的研究.兽类学报,18(1):54~59.[Li J J,Wen S Y,Qi G X *et al*,1998. Studies on the mitochondrial DNA restriction map and RFLP of *Bandicota indica*. *Acta Theriologica Sinica*,18(1):54-59.]

吴德林,1982.我国大家鼠(*Rattus norvegicus* Berkenhout)的亚种分化.兽类学报,2(1):107~112.[Wu D L,1982. On subspecific differentiation of brown rat (*Rattus norvegicus* Berkenhout) in China. *Acta Theriologica Sinica*,2(1):107-112.]

周虞灿,景增春,温得启等,1985.几种害鼠血红蛋白型的研究.兽类学报,5(1):17~23.[Zhou Y C,Jing Z C,Wen D Q *et al*,1985. Investigation of hemoglobin types on some rodents. *Acta Theriologica Sinica*,5(1):17-23.]

萨姆布鲁克J,弗里奇E F,曼尼阿蒂斯T,1993.分子克隆实验指南.第二版.金冬雁等译.北京:科学出版社.481~482.(Sambrook J,Fritsch E F,Maniatis T,1993. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press.481-482.)

Avise J C,Lansman R B,Shade R O,1979. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural population. I. Population structure and evolution in the genus *Peromyscus*. *Genetics*,92:279-295.

Brown G G,Simpson M V,1981a. Intra- and interspecific variation of the mitochondrial genome in *Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*: restriction enzyme analysis of variant mitochondrial DNA molecules and their evolutionary relationships. *Genetics*,97:125-143.

Brown G G,Castora F J,1981b. Mitochondrial DNA polymorphism: Evolutionary studies on the genus *Rattus*. *Annals of New York Acad. of Sci.*,361:135-153.

Gadaleta G,Pe pe G,De Candia G *et al*,1989. The complete nucleotide sequence of the *Rattus norvegicus* mitochondrial genome: Cryptic signals revealed by comparative analysis between vertebrates. *J. Mol. Evol.*,28:497-516.

Graaff G D E,1981. The rodents of Southern Africa. Durban,Pretoria: Butter Worths. 225.

Nei M,Li W-H,1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*,76(10):5269-5273.

Walker E P,1991. Walker's mammals of the world (Vol. Ⅱ). 5th edition. Baltimore and London: The Johns Hopkings Press. 785.

Yonekawa H,Moriwaki K,1981. Evolutionary relationships among five subspecies of *Mus musculus* based on restriction enzyme cleavage patterns of mitochondrial DNA. *Genetics*,98:801-816.

MITOCHONDRIAL DNA POLYMORPHISM OF *Rattus norvegicus* IN CHINA

LI Jing-jing[①②] PENG Tong-xu[①] WEN Shuo-yang[①] XIE Yi-qian[①]

(①*Guangdong Institute of Entomology, Guangzhou 510260 genet@gdei.gis.sti.gd.cn*)

(②*The School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou* 510275)

Abstract Twenty-six samples of *Rattus norvegicus* from 8 localities in China were used for the investigation of the genetic polymorphism by means of mitochondrial DNA (mtDNA) RFLP analysis. The mtDNA of each sample was digested with 12 restriction endonucleases, *Apa* Ⅰ, *Ava* Ⅰ, *Bam* HⅠ, *Bcl* Ⅰ, *Bgl* Ⅰ, *Cla* Ⅰ, *Eco* RⅠ, *Eco* RⅤ, *Hin* dⅢ, *Pvu* Ⅱ, *Sca* Ⅰ and *Xba* Ⅰ. The fragment patterns were examined by agarose gel electrophoresis or by Southern hybridization with DIG-labeled mtDNA probe. Twenty restriction morphs have been recognized, which can be grouped into 11 haplotypes. Extensive mtDNA polymorphism was found between individual animals, within and among populations of Chinese *R. norvegicus*. Almost each of populations had distinct mtDNA haplotype, some with more than one type. The divergence for the 11 detected haplotypes ranged from 0.2% to 1.4%, comparable to that previously reported for the rats from the United States, Japanese and the laboratory type. The findings are helpful for understanding the dispersion and evolution of this animal.

Key words *Rattus norvegicus*, Mitochondrial DNA (mtDNA), RFLP, Genetic polymorphism